



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

Programa de Segunda Especialización en Medicina Humana

**Sensibilidad y patrones de inmunofluorescencia
indirecta de los anticuerpos antinucleares en las
enfermedades reumatológicas sistémicas
Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título de Especialista en Patología Clínica

AUTOR

Arturo Ampelio III SAGÁSTEGUI SOTO

ASESOR

Ausberto CHUNGA CHUNGA

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sagástegui A. Sensibilidad y patrones de inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos antinucleares en las enfermedades reumatológicas sistémicas Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins [Trabajo de investigación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2007.

SENSIBILIDAD Y PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LAS ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS SISTÉMICAS

HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS

RESUMEN

Se revisaron 155 casos de pacientes con diagnóstico de enfermedad reumatológica sistémica atendidos en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins durante los años 2002 y 2003 para determinar la sensibilidad y los patrones de inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos antinucleares asociados a ellas.

De todos los patrones de inmunofluorescencia encontrados, el moteado apareció en todas las enfermedades estudiadas (Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, Síndrome de Sjogren, Poli/dermatomiositis, Esclerosis Sistémica, Síndrome CREST, enfermedad mixta del tejido conectivo), mientras que el menos frecuente fue el patrón periférico, que solo apareció en el LES. Las sensibilidades más altas se obtuvieron en Esclerosis sistémica, Lupus Eritematoso Sistémico y enfermedad mixta del tejido conectivo.

En conclusión, los patrones de inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos antinucleares no son específicos para una enfermedad determinada, por lo que se requiere complementar estas pruebas con las de autoanticuerpos antinucleares específicos, guiándose siempre del contexto clínico.

Palabras Clave: Anticuerpos Antinucleares, Inmunofluorescencia Indirecta, Enfermedades Reumatológicas Sistémicas.

INTRODUCCIÓN

La medición de **anticuerpos antinucleares (ANA, antinuclear antibodies)** en el suero, es la prueba de screening más frecuentemente realizada para detectar anticuerpos en pacientes en quienes se sospecha de una **enfermedad reumatológica sistémica (ERS)**. Los ANA ocurren en pacientes con una variedad de enfermedades auto inmunes (1, 2, 3, 4) órgano específicas o sistémicas, pero ellos son particularmente comunes en ERS, las cuales incluyen al Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, Síndrome de Sjögren, Polidermatomiositis, Esclerosis Sistémica, Síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia, telangiectasias).

Constituye la mejor prueba para excluir el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) en niños o adultos pero es también una de las pruebas más sobre-usadas en el laboratorio(5). Aun cuando tiene una excelente sensibilidad y una razonable especificidad su valor predictivo positivo en muchos lugares es bajo debido a su abuso en las poblaciones de bajo riesgo (6).

En los últimos años habido un cambio notable en la evolución de las pruebas de ANA. Se ha pasado de la subjetividad a datos objetivos y por otro lado, la industria ha mejorado la eficiencia al pasar de procedimientos manuales a procedimientos automatizados. Sin embargo, la extensa variedad de técnicas, métodos, sustratos y resultados en las pruebas de ANA no ha hecho sino crear o aumentar la confusión. Aunado a esto, existe también una extensa literatura sobre el tema, de las que podemos destacar las excelentes revisiones de Kavanough et al (7), Sólonon et al (8) y Keren (9). La mayoría de datos de esta introducción se han tomado de este último trabajo.

La primera prueba de laboratorio para detectar LES fue el **fenómeno LE** descrito por Hargraves en 1948. Debido al costo y a la subjetividad de esta prueba y a la presencia de análisis mas rápidos y de alta especificidad tales como DNAs o anti SM la prueba de células LE esta siendo dejada de lado (10, 11)

El próximo mayor desarrollo en las pruebas de **tamizaje de ANA** fue el desarrollo de la Inmunofluorescencia Indirecta (**ANA IFI**) en los años 50. Se ha usado una variedad de sustratos incluyendo secciones congeladas de riñón de roedores, secciones congeladas de hígado de roedores y líneas celulares de tejidos cultivados. La línea celular de tejidos cultivados HEp-2 ha sido uno de los sustratos mas populares en la década pasada. Las células HEp2 son mas fáciles de leer que los sustratos anteriores. El tamaño de las células HEp2 (mayor que los sustratos de roedores) aumenta la habilidad para detectar patrones de manera consistente. Además algunos antígenos como el centrómero son extremadamente difíciles de detectar en las secciones congeladas de hígado o riñón de roedor y sí son rápidamente evidentes en las células HEp2. Estas células pueden fijarse con acetona para mejorar la preservación del antígeno rápidamente soluble en agua SSA/Ro que la que se logra con la fijación por etanol. Anteriormente la causa mas común de una prueba de ANA falso negativa era un individuo que producía principalmente anti SSA/Ro (el antígeno que a menudo era lavado debido a fijación inadecuada).

Las características de LES ANA negativo con SSA/Ro positivo definen a un subtipo de pacientes con LE cutáneo subagudo. Las versiones más recientes de ANA-IFI que usan células HEp2 fijadas para preservar el antígeno SSA/Ro son capaces de detectar hasta el 98% de casos de LES, dándole a la prueba de ANA-IFI un alto valor predictivo negativo.

El uso de estos sustratos rápidamente desembocó en el reconocimiento de varios **patrones de tinción nuclear** que podían ser distinguidos. Además la fuerza de la actividad de ANA pudo cuantificarse determinando el título. Aunque se pueden ver varios patrones, los patrones de las líneas celulares HEp2 que son los más útiles son: homogéneo, periférico, moteado, nucleolar y centrómero.

Muchos pacientes con LES tienen más de un tipo de patrón. Los patrones a menudo se distinguen mejor cuando se usan diferentes diluciones del suero. Por ejemplo, la presencia de un patrón homogéneo puede oscurecer la presencia de un patrón nucleolar, que puede volverse aparente con el uso de una dilución mayor del suero del paciente.

El **patrón periférico** en sustratos de secciones congeladas de roedor tiene fluorescencia principalmente alrededor de la periferia del núcleo. Era el patrón más cercanamente asociado con el diagnóstico de LES. Este patrón es consistente con la presencia de anticuerpos contra DNAds (double strand o doble cadena o nativo) o contra DNAss (single strand). Desafortunadamente, los anticuerpos contra la **membrana nuclear** misma dan un patrón similar en los sustratos de secciones congeladas y no son específicos para LES (Fig 1). Muchos antígenos se asocian con los anticuerpos antimembrana. Los determinantes antigénicos de la membrana nuclear incluyen gp210, p62, lámina y lamin b. Los anticuerpos contra estos determinantes han sido asociados con cirrosis biliar primaria. Con los sustratos HEp2 sin embargo este patrón se puede distinguir del patrón homogéneo por que no hay tinción de las figuras mitóticas con la membrana antinuclear (Fig. 2). El patrón homogéneo en sustratos de roedores se diferenciaba del patrón periférico (los anticuerpos responsables del patrón homogéneo en los sustratos de secciones congeladas incluían anti DNAds, anti histona y anti DNAss), en contraste, en los sustratos HEp2 el patrón periférico a menudo no se distingue del patrón homogéneo.

El **patrón homogéneo** en sustratos HEp2 requiere que el núcleo se tiña de manera homogénea, ocasionalmente con énfasis hacia la periferia del núcleo y las figuras mitóticas deben también teñirse (Fig. 3). Este tipo de patrón puede resultar de anti DNAds, anti DNAss y antihistona. Mientras que los anticuerpos antihistona y los anticuerpos anti DNAss están a menudo presentes en el LES, ellos carecen de la especificidad para la enfermedad que sí tiene el anti DNAds. Algunos anticuerpos antihistonas (antiH1) se asocian con el fenómeno de células LE. Otros anticuerpos antihistona, sin embargo, se asocian con Lupus inducido por drogas. La procainamida se asocia con anticuerpos contra histonas H2A y H2B; la hidralazina se asocia con determinantes antigénicos H3 H4. Uno de los métodos más comúnmente usados para determinar el anti DNAds involucra a la *Crithidia Luciliae*, un pequeño hemoflagelado que contiene una estructura llamada quinetoplasto.

El quinetoplasto contiene DNAds pero no DNAss. Consecuentemente se puede realizar una prueba de inmunofluorescencia indirecta usando la *Crithidia Luciliae* como sustrato

para el suero del paciente, además para detectar el anti DNAs con esta técnica la fuerza de la reactividad puede estimarse por titulación.

El **patrón moteado** es el patrón de ANA menos específico por que denota la presencia de anticuerpos contra una amplia variedad de antígenos nucleares y citoplasmáticos (Fig. 4). Con la excepción del patrón centrómero y la sensibilidad de algunos antígenos a la digestión enzimática, el patrón moteado mismo no es capaz de distinguir entre los muchos antígenos que están incluidos en este patrón.

Un término antiguo para muchos de los antígenos que resultan en el patrón moteado es **Extractable Nuclear Antigens (ENA)**. Originalmente, ENA se refería a dos antígenos específicos: Smith (Sm, por la primera persona que tuvo reactividad de este anticuerpo demostrado), y ribonucleoproteínas (RNP).

Ambos dan un patrón típicamente moteado en sustratos de sección de tejidos congelados.

El **Sm** es una proteína del complejo proteína RNA . Alrededor de 15 a 30% de pacientes con LES tiene este anticuerpo. Cuando esta presente es altamente específico para LES.

El antígeno **RNP** existe en el mismo complejo molecular del Sm. El anti RNP se encuentra en títulos altos en el 95 a 100% de pacientes con Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC).

Los otros dos antígenos que se han incluido bajo el término ENA son **SSA/Ro** y el **SSB/La**. Anticuerpos contra estos antígenos fueron detectados primero en pacientes con síndrome de Sjogren, LES y artritis reumatoidea.

Otro antígeno nuclear extractable importante es el **anti Jo-1**. Con las células HEp2 dan predominantemente moteados citoplasmáticos con leve tinción nuclear. Este anticuerpo se encuentra en alrededor de un tercio de pacientes con polimiositis-dermatomiositis. Actualmente contamos con una variedad de métodos para los ENA: contraelectroforesis, ELISA, inmunoblot, IFI así como una gran cantidad de artículos sobre cada uno de estos anticuerpos específicos (12, 13, 14, 15, 16).

Dos anticuerpos que dan patrones nucleares por ANA-IFI se asocian con esclerodermia.

Los **anticuerpos anticentrómero** son útiles para detectar la variante de esclerodermia caracterizada por la presencia de calcinosis , fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasias (variante CREST). Este auto anticuerpo generalmente esta presente en pacientes con una forma limitada de la enfermedad en oposición a los pacientes que son positivos para **anti Scl-70** quienes mas probablemente tienen esclerodermia sistémica. Los anticuerpos anticentrómero son rápidamente reconocidos en los sustratos Hep-2 por el característico moteado discreto que delinea a los cromosomas en las figuras mitóticas (Fig 5). Cerca del 5% de pacientes con LES tienen anticuerpos anticentrómero.

El anti Scl-70 esta presente en cerca del 40% de pacientes con esclerodermia con compromiso cutáneo difuso y aquellos que probablemente desarrollaran fibrosis pulmonar intersticial.

El **patrón nucleolar** es uno de los más cercanos asociados con la presencia de esclerodermia (Fig 6). Los autoantígenos específicos que se han identificado como blancos incluyen Scl-70, proteínas centrómero, RNA polimerasa, U3 fibrilarina asociada a RNP, PMScl y 72 RNP; la mayoría de estos antígenos produce patrones nucleolares o mixtos en las pruebas de ANA IFI. El patrón predominantemente nucleolar puede ocurrir también en LES pero esta presente en menos del 1% de estos pacientes.

Variables en las pruebas de ANA IFI.

Hay muchas variables a tener en cuenta. El laboratorio debe decidir cuál de los muchos kits disponibles comercialmente usará. Hay diferentes variedades de sustratos, desde hígado y riñón de ratón o rata hasta células HEp-2. Estos sustratos tienen diferentes antígenos a diferentes concentraciones, por consiguiente la sensibilidad de la prueba varía con los sustratos usados. Otra variable a considerar es el conjugado anti humano IgG- fluoresceína que puede tener diferentes grados de afinidad.

El laboratorio necesita determinar la dilución cut-off más adecuada del suero del paciente. El cut-off varía con diferentes factores: el kit usado, el tipo de microscopio, la fuente de luz, la apertura del lente, el tipo de filtro y el tipo de condensador.

Si se usa una concentración de suero lo suficientemente alta la mayoría de la población tendrá un resultado positivo en el screening de ANA. Los pacientes con LES y otras enfermedades de tejido conectivo a menudo tienen reactividad para ANA a títulos significativamente aumentados (17).

Debido a las numerosas variables descritas se aconseja que cada laboratorio determine su propio cut-off en su propia población. Algunos recomiendan que se use el suero de 200 controles saludables con un amplio rango de edad e igualmente distribuidos por sexos para determinar el cut-off. La dilución usada debería dar resultados negativos en al menos el 95% de los controles normales saludables.

Igualmente debe seguirse un programa de control de calidad, donde pueden usarse sueros de referencia (18, 19, 20).

Selección de pacientes y pruebas de ANA.

La selección inicial de pacientes es el primer punto crítico que determina el valor predictivo de las pruebas de ANA. Cuando una prueba se realiza en suero de paciente seleccionado con una alta probabilidad de sufrir la enfermedad en particular, el valor predictivo de un resultado positivo generalmente es alto. En contraste, cuando la misma prueba se realiza en una población de baja incidencia, la probabilidad de un resultado falso positivo puede llegar a ser mucho mayor que un resultado verdadero positivo. Las pruebas de ANA tienen un porcentaje de resultados falsos positivos de 20% o más. Debido a esto la sensibilidad de la prueba de ANA para detectar pacientes con LES (mayor de 95%), disminuye aparentemente por un pobre desempeño cuando se selecciona una población de baja incidencia.

Evitar el sobre-uso es la clave para mejorar el valor predictivo positivo de las pruebas de ANA. Después de que una prueba de ANA es positiva bajo condiciones apropiadas de screening, la determinación de cuál autoanticuerpo específico está presente debe tener en consideración los síntomas específicos de cada paciente. Cuando la prueba de ANA es positiva ello confirma que algún antígeno dentro del núcleo de la célula reacciona con el

suero del paciente. Hay muchas pruebas de autoanticuerpos específicos disponibles. Se recomienda que la selección de las pruebas de autoanticuerpos específicos se haga siguiendo un flujograma ordenado según el cuadro clínico del paciente.

Métodos para las pruebas de ANA

Actualmente otros métodos tales como técnicas de ELISA e inmunoblot se han desarrollado como alternativas a la IFI (21, 22, 23, 24, 25, 26)). Hay muchos trabajos en los que se compara los métodos EIA e IFI para la detección de ANA en pacientes con ERS en los que se demuestra que son substancialmente equivalentes.(27-36) Los dos métodos también dan resultados similares en pacientes ANA positivos con otros diagnósticos clínicos distintos de ERS, así como también en los controles sanos (37). Sin embargo, es probable que los EIA e inmunoblot no sustituirán a la IFI del todo en un tiempo próximo por varias razones. Hay mas de 30 antígeno-anticuerpo nucleares específicos que han sido identificados, y los sistemas de ELISA e IB actualmente disponibles son capaces de identificar de 10 a 12 de estos. Muchos anticuerpos específicos en las enfermedades humanas permanecen sin ser descubiertos y la IFI continuará siendo el método de elección para estos nuevos hallazgos, debido a que los sustratos de tejido teóricamente contienen el universo de antígenos celulares.

Finalmente, los análisis de ANA pueden ser un útil discriminante en el reconocimiento de ciertas condiciones patológicas, pero pueden crear desconcierto cuando sus limitaciones no son completamente apreciadas. (7, 8)

La actualización y profundización en este tópico mediante la revisión de publicaciones internacionales motiva el afinamiento en la interpretación clínica de los resultados de los estudios de detección de ANA, así como también el uniformizar criterios en los procedimientos de laboratorio. Siguiendo la dirección de este tópico, se pretende analizar los hallazgos clínicos de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas correlacionándolos con los hallazgos laboratoriales de las pruebas de detección de anticuerpos antinucleares con el método de inmunofluorescencia indirecta.

Los objetivos planteados son:

- Determinar la sensibilidad de los ANA-IFI en el diagnóstico de las ERS.
- Determinar los patrones de IFI para ANA en los pacientes con ERS.
- Determinar la frecuencia de positividad de la IFI con Crithidia Luciliae para anticuerpo antiDNA nativo (nDNA o dsDNA) en pacientes con LES.

MÉTODOS

Suero de pacientes e información clínica:

A partir de la base de datos del Servicio de informática se tomaron al azar, 155 casos de pacientes con enfermedades reumatológicas atendidos en el HNERM en el periodo 2001-2003 y que tenían pruebas de ANA-IFI. Los diagnósticos clínicos y otras características de laboratorio se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes.

Metodología de las pruebas:

Detección de anticuerpos antinucleares:

La detección de los anticuerpos antinucleares se realizó por IFI. Las muestras de suero, diluidas, se superponen sobre células HEp-2 fijas en una lámina. Si se encuentran presentes anticuerpos específicos en el suero, se forman complejos estables de antígenos y anticuerpos. Los complejos formados enlazan inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína. La reacción positiva resultante se observa como fluorescencia color verde manzana de los núcleos, cuando se ven con un microscopio fluorescente.

Detección de anticuerpos anti DNA nativo (nDNA):

La detección de anticuerpos anti DNA nativo se realizó por IFI. La muestra de suero del paciente es diluida en buffer y es depositada en una lámina que contiene los hemoflagelados *Crithidia Luciliae* (estos organismos poseen una gran mitocondria llamada Kinetoplasto, en cuyo interior hay una alta concentración de ADN de doble cadena o nativo).

Si se encuentran presentes anticuerpos específicos en el suero, se forman complejos estables de antígenos y anticuerpos. Los complejos formados enlazan inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína. La reacción positiva resultante se observa como fluorescencia color verde manzana de los kinetoplastos de las *Crithidias*, cuando se ven con un microscopio fluorescente.

RESULTADOS

De los 155 casos de pacientes con enfermedades reumatológicas revisados, 77 (49.7%) fueron positivos (con título $\geq 1/80$) para ANA-IFI. La frecuencia de los varios patrones obtenidos para estos sueros positivos se muestra en la tabla 1. El patrón moteado fue el más comúnmente observado, habiéndose presentado en todas las patologías estudiadas (AR, CREST, EMTC, ESP, LES, PM-DM, SS)

Tabla 1
Patrones Morfológicos en las pruebas de ANA-IFI

PATRON	N°	%
Moteado	39	50
Homogeneo	31	40
Periférico	3	4
Centrómero	2	3
Mixto	2	3
Total	77	100

La sensibilidad de la prueba, según las distintas enfermedades reumatológicas, se muestra en la Tabla 2.

La sensibilidad más alta fue para la Esclerosis Sistémica Progresiva (85%), seguida del Lupus Eritematoso Sistémico (65.5%) y de la Enfermedad Mixta del Colágeno (62.5%). Las sensibilidades más bajas se obtuvieron en el Sd. CREST (42.8%), Sd Sjögren (30%), Polidermatomiositis (25%) y en Artritis Reumatoide (21.2%).

Tabla 2
Sensibilidad de las pruebas ANA-IFI

	ANA POSITIVOS	TOTAL	SENSIBILIDAD %
A. Reumatoidea	7	33	21.2
CREST	3	7	42.8
EMTC	5	8	62.5
Esclerosis Sistémica	17	20	85
LES	36	55	65.5
Polidermatomiositis	3	12	25
Sd. Sjögren	6	20	30

Patrones de Inmunofluorescencia:

El patrón Moteado se observó en todas las patologías estudiadas.

El patrón Homogeneo se observó en: AR, ESP, LES, PM, SS.

El patrón Centrómero se observó en ESP y LES.

El patrón Periférico se observó en LES.

El patrón Mixto se observó en ESP.

Asociados por patologías, la ESP tuvo la mayor variedad de patrones, mientras que el Sd CREST mostró solo un tipo de patrón, como se detalla a continuación:

Tabla 3

Patrones morfológicos de ANA-IFI según patologías.

	HOMOGENEO % (n)	MOTEADO % (n)	PERIFERICO % (n)	CENTROMERO % (n)	MIXTO % (n)
A. Reumatoidea	43(3)	57(4)			
CREST		100(3)			
EMTC		80(4)		20(1)	
Esclerosis Sistémica	29(5)	53(9)		6(1)	12(2)
LES	53(19)	39(14)	8(3)		
Polidermatomiositis	33(1)	67(2)			
Sd. Sjögren	50(3)	50(3)			
Total	31	39	3	2	2

Anticuerpos anti DNA nativo:

De los 55 pacientes con diagnóstico de LES, 19 tuvieron resultados positivos para anticuerpos anti DNA nativo (sensibilidad: 34.5 %). Es de notar que todos los casos con anti DNAn se dieron en pacientes con pruebas de ANA-IFI positivas.

DISCUSION.

Las pruebas de Anticuerpos Antinucleares forman una parte importante del diagnóstico inmunológico, asistiendo al clínico en el diagnóstico de una variedad de desórdenes y frecuentemente en el pronóstico. En este trabajo hemos reportado los patrones de inmunofluorescencia que se asocian a las enfermedades reumatológicas más relevantes en los pacientes de nuestro hospital.

En todas las patologías estudiadas se encontraron 2 o más patrones asociados, (con la excepción del Sd CREST pues en los 3 pacientes estudiados solo se encontró patrón moteado, esto, debido probablemente a la poca cantidad de pacientes) lo que demuestra la poca especificidad de los patrones de IFI, en concordancia con varios estudios publicados.

En cuanto a la sensibilidad de las pruebas de ANA IFI, las mas altas fueron para ESP (85%), LES (65.5%) y EMTC (62.5%). Estudios al respecto muestran valores diversos; para ESP la revisión de Solomon et al arroja valores de 85%; para LES los valores van desde 46% (38) hasta 100% (39) y para EMTC encontramos (40) valores de 100%.

En lo que se refiere a AR, SS, PDM y Sd. CREST, la revisión de Solomon (8) de 21 artículos sobre el tema, arroja también bajas sensibilidades para estas patologías.

En cuanto a LES, si bien hemos dicho que las positividades de ANA varían desde 46% hasta 100%, la sensibilidad global extraída de 21 estudios seleccionados por criterios de Medicina Basada en Evidencias (8) es de 93%. Llama la atención entonces la baja sensibilidad para LES encontrada en nuestro estudio (65.5%). Estos resultados podrían explicarse por tratamientos previos a la prueba, y convendría también hacer un estudio de sensibilidad y especificidad de la prueba de ANA-IFI en personas sanas para evaluar el cut-off usado. En lo que respecta a la prueba de nDNA, la baja positividad encontrada podría deberse a lo anteriormente dicho.

CONCLUSIONES:

Las pruebas de anticuerpos antinucleares positivas se asocian a varias enfermedades reumáticas sistémicas (y a un gran número de otras condiciones).

Los patrones de inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos antinucleares no son específicos para una enfermedad determinada.

Las pruebas de anticuerpos antinucleares positivas deben complementarse con pruebas relacionadas para autoanticuerpos específicos (anticuerpos anti DNAs, antiRo, anti La, antiSm, anti nRNP, anti histonas, anti Scl-70, anti Jo-1), guiados siempre por el contexto clínico.

RECOMENDACIONES:

1. Debe usarse el sustrato Hep-2 para las pruebas de ANA.
2. Los resultados de las pruebas de ANA deben reportarse incluyendo una descripción del título más alto en el que se detecta la inmunofluorescencia.
3. Deben usarse controles positivos y negativos cada vez que se realice la prueba.
4. Debería tenerse un registro de personas sanas (controles) con la descripción de los títulos de ANA obtenidos.
5. Realizar un trabajo en un futuro próximo aplicando las pruebas de ANA-IFI a personas sanas para determinar el número y títulos de positividad.
6. Participar en un programa de control de calidad externo.
7. Tener presente las revisiones: **“Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Antinuclear Antibody testing”**(8) y **“Guidelines for clinical use of the Antinuclear Antibody Test and tests for specific Autoantibodies to Nuclear antigens”**(7), preparadas por representantes del Colegio de Patólogos Americanos, del Colegio Americano de Reumatología y de la Sociedad de Inmunología Clínica y Centro Clínico de los Institutos Nacionales de Salud. En ellas se establece lo siguiente:

TABLA 4

CONDICIONES ASOCIADAS CON RESULTADOS ANA-IFI POSITIVOS	
Enfermedad	Resultados ANA positivos (%)

LAS PRUEBAS DE ANA SON MUY UTILES PARA EL DIAGNOSTICO EN:	
Lupus Eritematoso Sistémico	95-100
Esclerosis Sistémica.	60-80

SON ALGO UTILES PARA EL DIAGNOSTICO EN:	
Sd Sjögren	40-70
Polidermatomiositis	30-80

SON MUY UTILES PARA EL MONITOREO Y PRONOSTICO EN:	
Artritis Crónica Juvenil con uveítis	20-50
Fenómeno de Raynaud	20-60

SON PARTE CRITICA DE LOS CRITERIOS DIAGNOSTICOS EN:	
Lupus asociado a drogas	100
Enfermedad mixta del tejido conectivo.	100
Hepatitis autoinmune.	100

NO SON UTILES PARA EL DIAGNOSTICO EN:	
Artritis Reumatoide	30-50
Esclerosis Múltiple	25
Púrpura Trombocitopénica Idiopática	10-30
Enfermedades infecciosas	Varía
Enfermedad tiroidea	30-50
Fibromialgia	15-25
Lupus discoide	5-25
Enfermedades malignas	Varía
Pacientes con implantes de silicona mamarios	15-25
Parientes de pacientes con enfermedades autoinmunes	5-25

PERSONAS NORMALES (Títulos)	
$\geq 1 : 40$	20-30
$\geq 1 : 80$	10-12
$\geq 1 : 160$	5
$\geq 1 : 320$	3

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

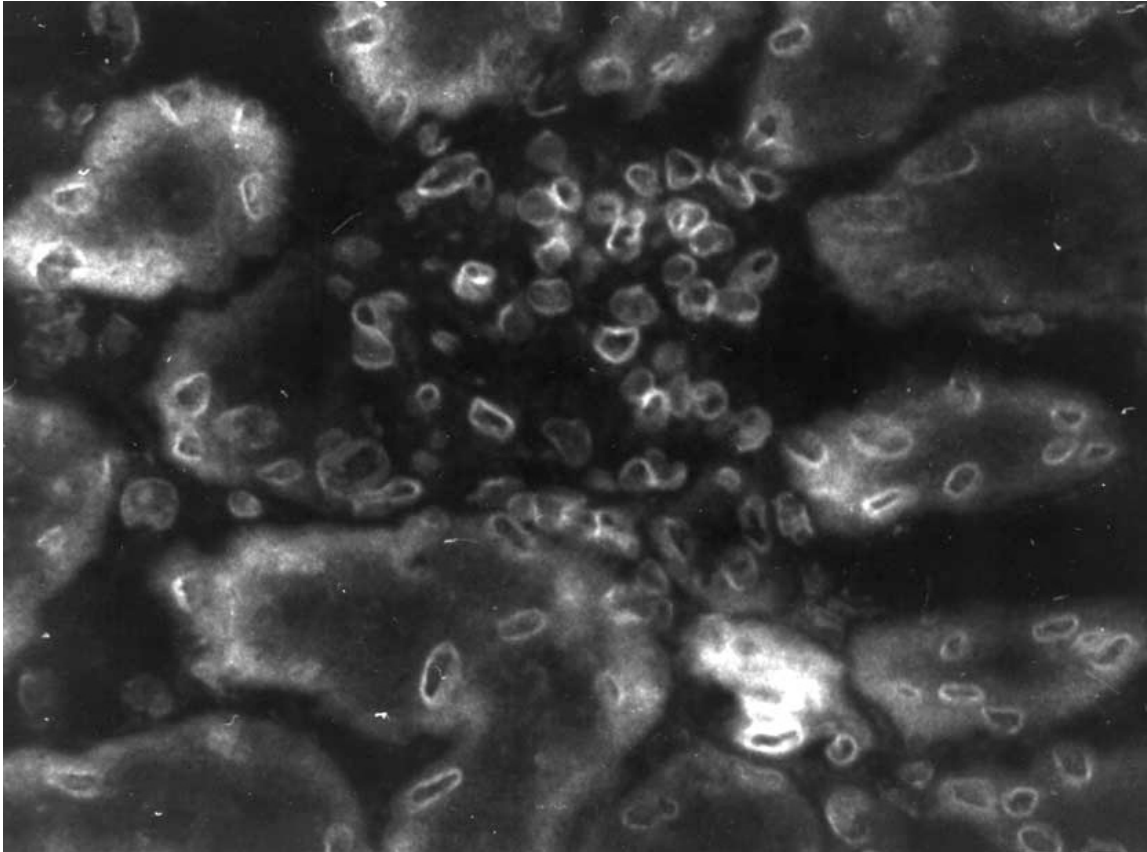
1. **Garde JB.** Autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. *Actas dermosifiliogr* 1999; 90: 1-7.
2. **Von Muhlen CA, Tan EM.** Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars Arth Rheum* 1995; 24: 323-358.
3. **Adams BB, Mutasim DF.** The diagnostic value of antinuclear antibody testing. *Int J Dermatol.* 2000; 38: 887-91.
4. **Mutasim DF, Adams BB.** Apractical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue diseases. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 159-174.
5. **Reeves GEM.** Update on the immunology, diagnosis and management of systemic lupus erithematosus. *Int Med J.* 2004; 34: 338-347.
6. **Wiik, AS.** Appropriateness of autoantibody testing in clinical medicine. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 177-180.
7. **Kavanaugh A, et al.** Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
8. **Solomon DH, et al.** Evidence-based guidelines for the use of inmunologic tests: Antinuclear Antibody testing. *Arthritis Care Res* 2002; 47: 434-444
9. **Keren DF.** Antinuclear antibody testing *Clin Lab Med* 2002; 22: 447-474
10. **Chiang M, Chia D, Barnett E.** Evaluation of fluorescent antinuclear antibody assays, Crithidia Luciliae substrate, and single stranded DNA-binding capacity in diagnosis of four rheumatic diseases. *J Clin Microbiol.* 1982; 15: 684-687.
11. **Hahn BH.** Antibodies to DNA. *NEJM* 1998; 338: 1359-1366.
12. **Lock RJ, Unsworth DJ.** Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol.* 2001; 54: 187-190.
13. **Phan TG, et al.** High quality, cost-effective strategy for detection of autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8: 471-474.
14. **Orton SM, et al.** Practical evaluation of methods for detection and specificity of autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Clin Diag Lab Immunol.* 2004; 11: 297-301.

- 15. Phan TG, Wong RC, Adelstein S.** Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens. Making detection and interpretation more Meaningful. *Clin Diag Lab Immunol.* 2002; 9:1-7.
- 16. Sanchez Guerrero J, et al.** Utility of anti-Sm, anti-RNP, antiRo/SS-A and anti-LaSS-B (Extractable Nuclear Antigens) detected by enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1055-1061.
- 17. Tan EM, et al.** Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1601-11.
- 18. Smolen JF, et al.** Reference sera for antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 413-18.
- 19. Peene I, et al.** Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1131-1136
- 20. Roberts-Thomson PJ, et al.** Antinuclear antibody testing in a regional immunopathology laboratory. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81: 409-412.
- 21. Kern P, Kron M, Hiesche K.** Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7: 72-8.
- 22. Ulvestad E, et al.** Evaluation of Diagnostic Tests for Antinuclear Antibodies in Rheumatological Practice. *Scand. J. Immunol.* 2000 (52), 309-315
- 23. Dahle C, et al.** Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening. Benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmun* 2004; 22: 241-248.
- 24. Wieser M, Pohla-Gubo G, Hintner H.** Antinuclear antibodies (ANA). Diagnostic value of different methods for screening and differentiation. *Clin Applied Immunol Rev.* 2001; 1: 201-206.
- 25. Cook L.** New methods for detection of antinuclear antibodies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998; 88: 211-220.
- 26. Kern P, Kron M, Hiesche K.** Measurement of antinuclear antibodies: Assessment of different test systems. *Clin Diag Lab Immunol.* 2000; 7: 72-78.
- 27. Emlen W, O'Neill L.** Clinical significance of antinuclear antibodies: Comparison of detection with immunofluorescence and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1612-18.

- 28. Homburger HA, et al.** Detection of antinuclear antibodies. Comparative evaluation of Enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. *Arch Pathol Lab Med.* 1998 (122) 993-99.
- 29. Nobuhide Hayashi, et al.** Detection of Antinuclear Antibodies by Use of an Enzyme Immunoassay with Nuclear HEp-2 Cell Extract and Recombinant Antigens: Comparison with Immunofluorescence Assay in 307 Patients. *Clin Chem* 2001;47:9 1649–1659.
- 30. Gonzales C, et al.** Antinuclear antibodies (ANA) screening by enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: analytical and clinical evaluation. *Clin Biochem* 2002; 35: 463-469.
- 31. Gniewek R, et al.** Comparison of Antinuclear Antibody Testing Methods: Immunofluorescence Assay versus Enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 185-188.
- 32. Reisner BS, Di Blasi J, Goel N.** Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:503-506.
- 33. Bayer PM et al.** Multicenter evaluation study on a new HEp2 ANA screening enzyme immune assay. *J Autoimmun* 1999; 13(1): 89-93
- 34. Olaussen E, Rekvig OP.** Screening tests for Antinuclear Antibodies (ANA): Selective use of central nuclear antigens as a rational basis for screening by Elisa. *J Autoimmun.* 1999; 13: 95-102.
- 35. Tan EM, et al.** A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies of defined specificities. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 455-464.
- 36. Fenger M, et al.** Detection of antinuclear antibodies by solid-phase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem* 2004; 11: 01-07.
- 37. Kumagai S, Hayashi N.** Immunofluorescence – Still the gold Standard in ANA testing? *Scand J Clin Lab Invest. Suppl.* 2001; 235: 77-83.
- 38. Davis p, et al.** Serological profiles in the connective tissue diseases in Zimbabwean patients. *Ann Rheumatic dis* 1989; 48: 73-76.
- 39. Mulli JC, Cruchaud A.** Immunoreactividad to nuclear antigens in Systemic Lupus Erythematosus with or without nephritis and in other connective tissue diseases, with particular reference to the RNA-protein antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 1977; 53: 279-289.
- 40. Nisengard RJ, et al.** Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. Importance of antinuclear antibody titers and peripheral staining patterns. *Arch Dermatol* 1975; 111: 1298-1300.

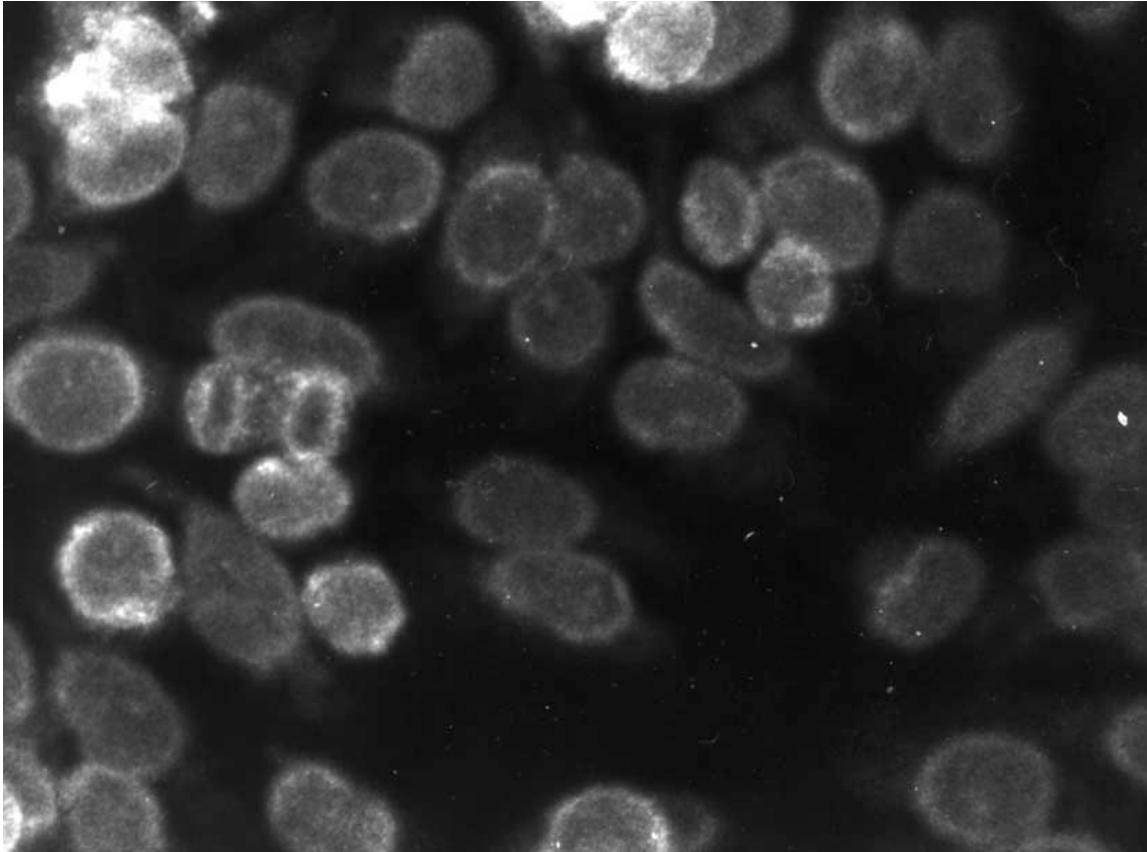
ANEXOS

FIGURA N° 1



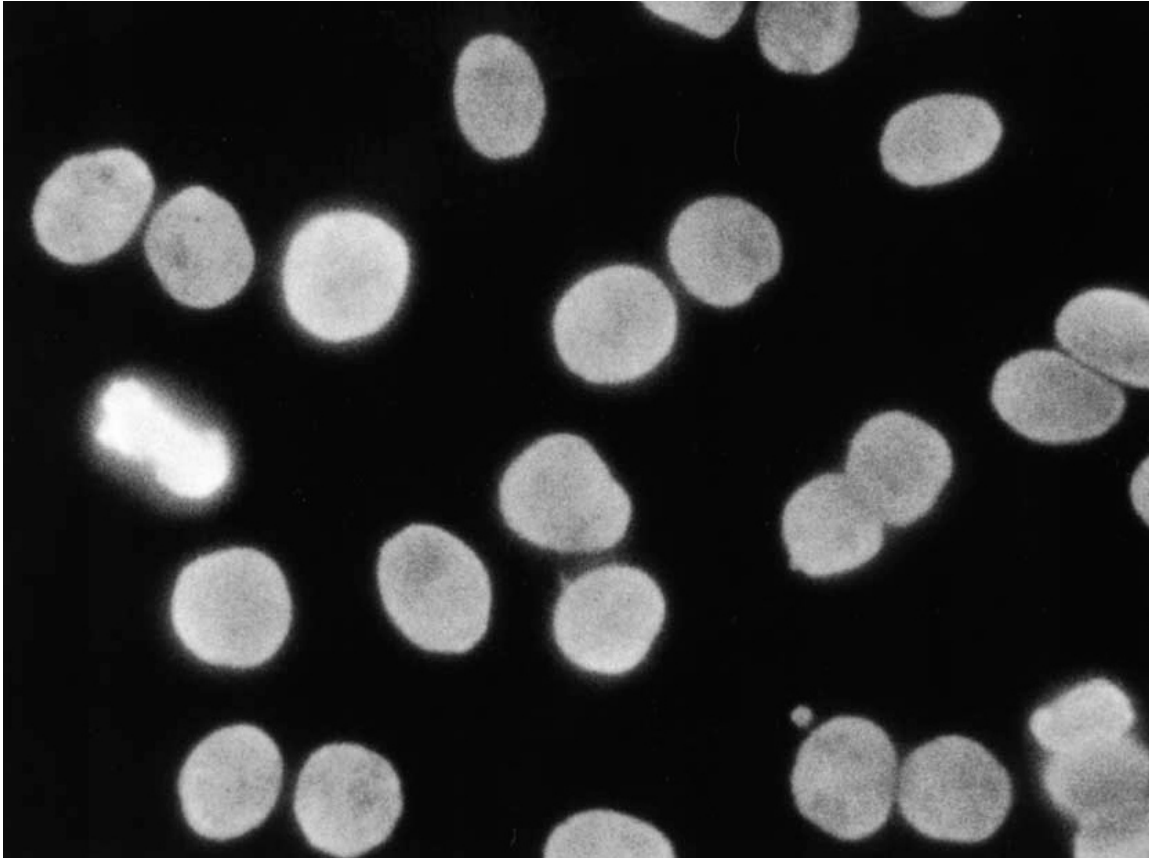
* El patrón **membrana nuclear** no puede distinguirse del **patrón periférico** en esta sección congelada de riñón de roedor.

FIGURA N° 2



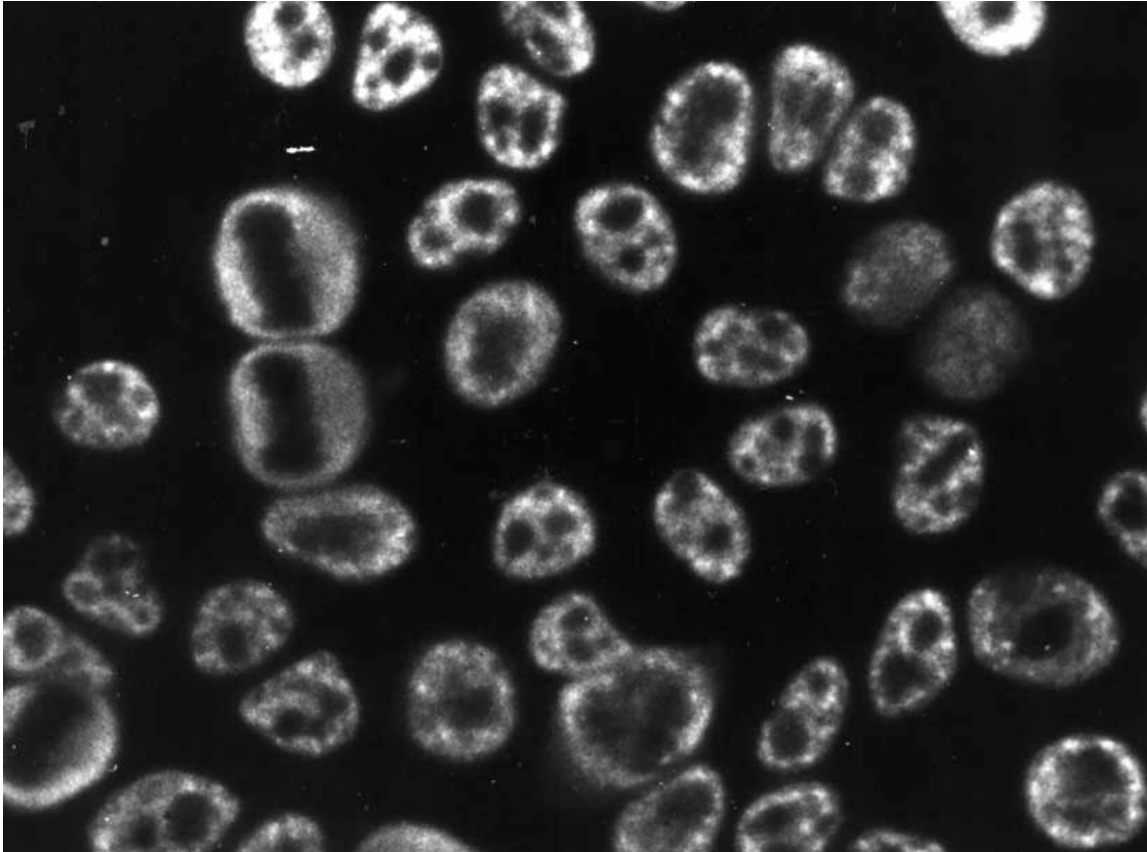
* El patrón **membrana nuclear** es evidente en este sustrato HEp-2 debido a la falta de tinción central en la figura mitótica localizada a las 9.

FIGURA N° 3



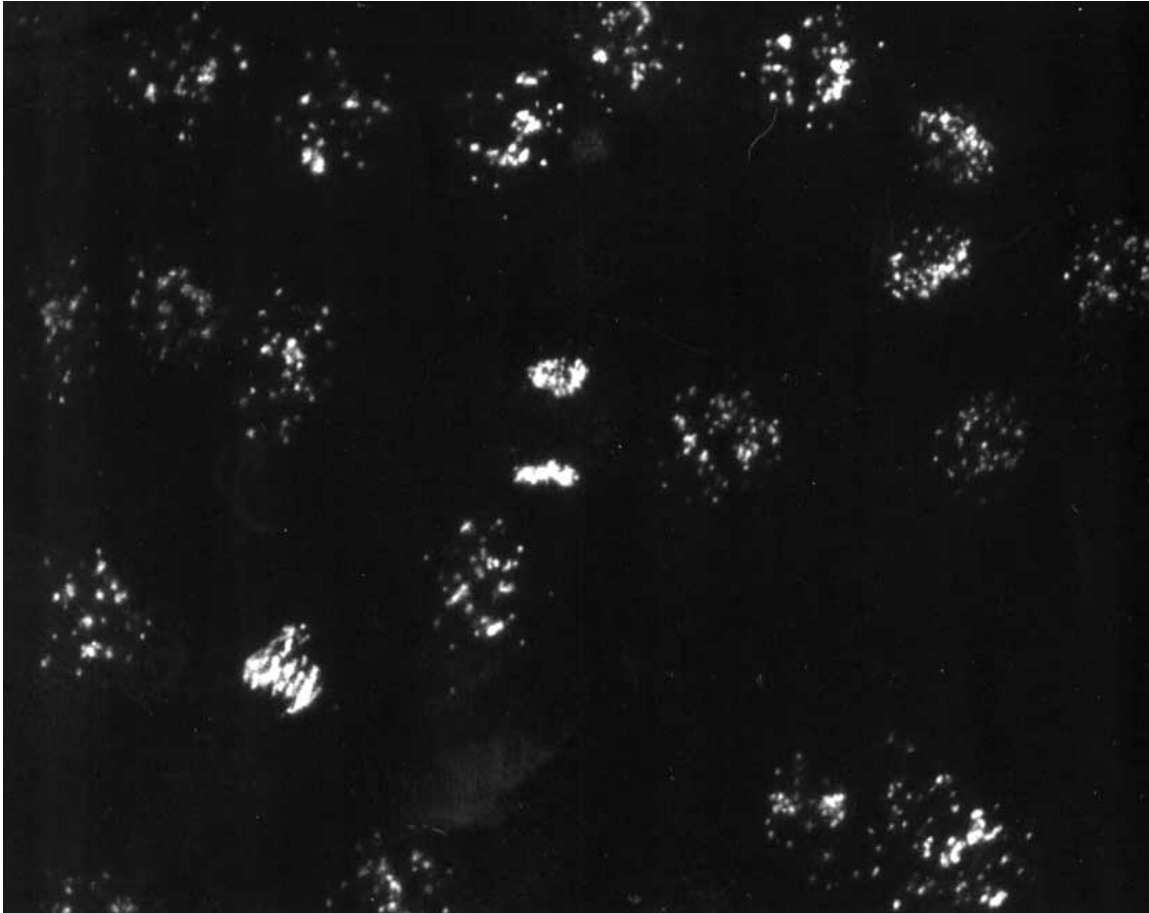
* El **patrón homogéneo** se demuestra en el sustrato HEp-2 con la fuerte tinción de la figura mitótica a las 9.

FIGURA N° 4



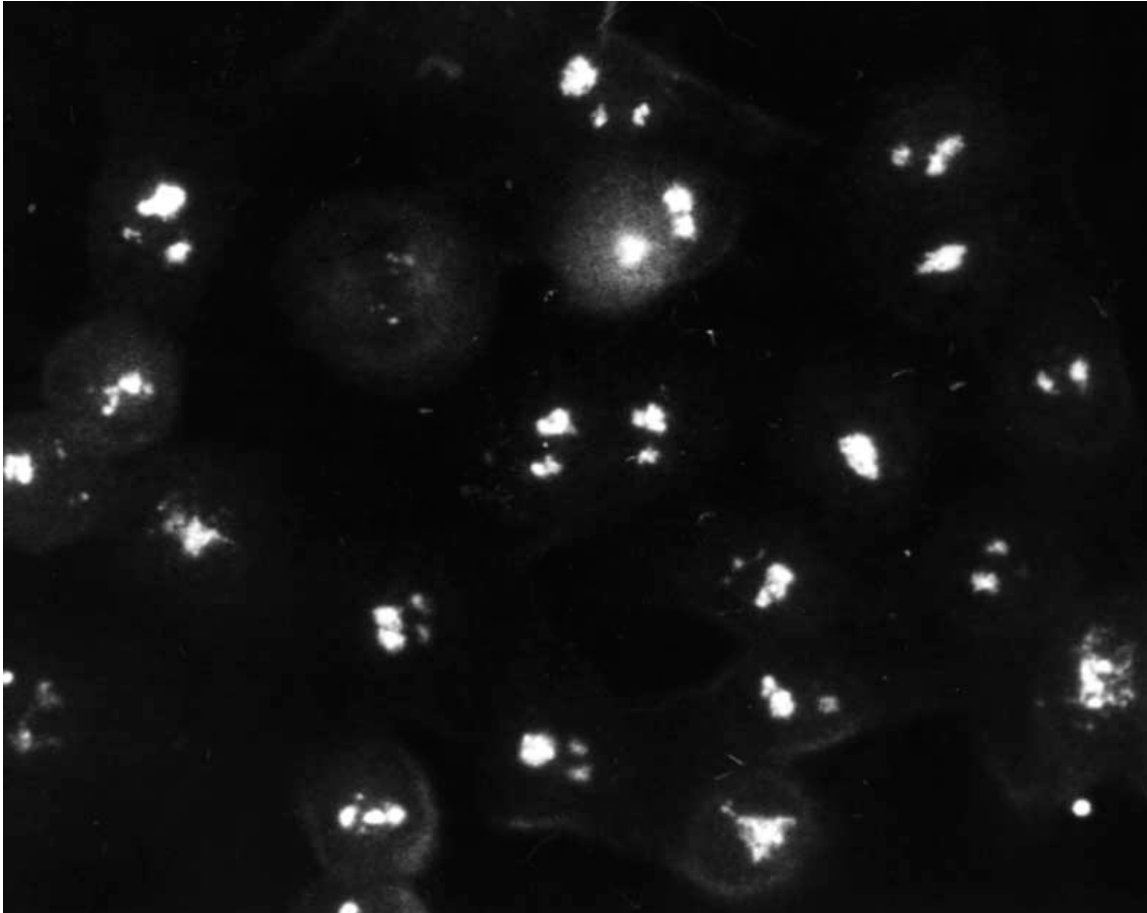
* El **patrón moteado** se demuestra en sustrato HEP-2 por la falta de nucleolos en todas las células y por la carencia de tinción central en las figuras mitóticas.

FIGURA N° 5



* El **patrón centrómero** se demuestra en el sustrato HEp-2.

FIGURA N° 6



* Los grandes nucleolos en las células HEP-2 son evidentes en este **patrón nucleolar**.

* Todas las figuras han sido tomadas de Keren DF/Clin Lab Med 22(2002)447-474

FLUJOGRAMA PARA LA PRUEBA DE ANA⁷

